

CONTROLLI ISTOLOGICI SU LESIONI DA *SAPROLEGNIA SPP.*
IN TROTA FARIO (*SALMO TRUTTA*) E IRIDEA (*SALMO*
GAIRDNERII), TRATTATE CON CASO
(NaCl 67% E CaCl₂ 33%)

HISTOLOGICAL CONTROLS OF *SAPROLEGNIA SPP.* LESIONS IN
BREEDING BROWN TROUT (*SALMO TRUTTA*) AND RAINBOW TROUT
(*SALMO GAIRDNERII*) TREATED WITH CASO (NaCl 67% CaCl₂ 33%)

PAOLO MANI⁽¹⁾, ELIO CACCIUTTOLO⁽²⁾, SILVIA ZANOBINI⁽²⁾, FRANCESCA
MANCIANTI⁽¹⁾, GIACOMO ROSSI⁽³⁾.

RIASSUNTO

Sono riportati i risultati dei controlli istologici effettuati su soggetti colpiti da Saprolegnosi, e sottoposti a trattamento con CASO (NaCl 67% e CaCl₂ 34%) alla concentrazione di 1,5% in vasca di medicazione. Dopo 24 ore e a 7 giorni di permanenza in vasca di medicazione, alcuni soggetti sono stati prelevati e sottoposti a controllo clinico e prelievo di tessuto dal margine e dalla parte centrale delle lesioni cutanee mediante bisturi rotondo da dermatologia. Inoltre sono stati prelevati campioni di rene, milza e branchie. I campioni sono stati fissati in paraformaldeide e dopo alcuni giorni fissati in resina JB4 per la microscopia ottica. Sezioni di tessuto di 5micron di spessore sono stati montati su vetrino e colorati con blumetilene/blu toluidina. I risultati mostrano che dopo 24 ore di trattamento la patina micotica cade lasciando scoperto il tessuto muscolare sottostante. Il controllo istologico degli organi, a 7 giorni, ha mostrato la normostruttura dei tessuti e a livello cutaneo l'inizio dei processi di cicatrizzazione e riepitelizzazione delle lesioni. I processi riparativi su lesioni di diversa estensione e gravità, associati alla negatività riscontrata ai controlli micologici e batteriologici, evidenziano l'efficacia del trattamento in vasca di medicazione.

Parole chiave: saprolegniosi, CASO Solvay, istologia.

SUMMARY

We show the results of histological controls performed on trouts with saprolegniosis and treated, in a medicated fish-pond, with CASO (NaCl 67% e CaCl₂ 34%) at the

⁽¹⁾Dipartimento Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

⁽²⁾Collaboratore esterno.

⁽³⁾Dipartimento di scienze veterinarie, Università di Camerino.

concentration of the 1.5%. At 24 hours and 7 days of treatment in the medicated fish pond some trout were slaughtered for histological exams. Samples of kidney, spleen, gill and biopsy of the skin at level of ulcerous lesions were taken. The various samples were fixed in paraphormaldeide and after some days embedded in JB4 resin for optic microscopy. Sections of 5 microns of thick were mounted on the slides and stained with blue methilene and blue toluidine. Our results show that after 24 hours of treatment the micotic coat of the ulcerous lesions in the skin get off, with the exposure of the muscle layer. The histological control on the visceral organs has shown the integrity of the tissues as well as the tissues of control trout, and the beginning of cicatrization and reepithelization in the skin lesions. The healing process of the lesions with various extension and seriousness, and the negativity of the mycological and bacteriological controls suggest the efficiency of the treatment in the medicated fish-pond for a period of 7 days.

Key words: saprolegniosis, CASO Solvay, histology.

INTRODUZIONE

La Saprolegniosi costituisce un grave problema di carattere sanitario ed economico sia nell'allevamento della trota fario (*Salmo trutta*) che iridea (*Salmo gairdnerii*). La micosi è infatti causa di perdite correlate alla mortalità nel settore dei riproduttori, in quello dell'incubazione e dell'avannotteria. Si tratta di un'infezione micotica sostenuta da "funghi acquatici" della Famiglia *Saprolegniaceae*, Classe *Oomycetes*, miceti saprofiti ambientali che sviluppano su materiale organico animale e vegetale e che, nelle acque dolci, possono attaccare cute e branchie di pesci, nei quali causano lesioni caratteristiche "a batuffolo d'ovatta" dovute allo sviluppo di micelio settato e ramificato.

Sono recettivi all'infezione gli adulti, i soggetti giovani ed in particolare i riproduttori nonché le uova in incubazione (Roberts, 1990). La Saprolegniosi compare in genere qualche settimana prima della spremitura, in seguito a lesioni traumatiche della cute conseguenti all'aggressività dei maschi e si aggrava dopo tale operazione, in conseguenza ai traumatismi della cattura oltre che per le manualità della spremitura stessa. Eccessiva densità dei riproduttori e scadente qualità dell'acqua favoriscono il diffondersi della malattia, che risulta essere correlata anche alla bassa temperatura dell'acqua che esalta l'azione del micete e riduce l'attività metabolica ed i meccanismi di difesa dei pesci (Roberts, 1990).

Le carenze igienico-sanitarie nelle operazioni di spremitura favo-

riscono la contaminazione delle uova e dello sperma, con pesanti perdite nella fase di incubazione e successiva diffusione del contagio alle larve e agli avannotti, dal momento che il micete, nelle vasche, si moltiplica attivamente anche sui tessuti dei pesci morti.

Le lesioni, localizzate frequentemente alla cute e alle branchie, si presentano come macchie bianco-giallastre focali, di forma pressoché circolare e contorno periferico in rilievo che in acqua assumono il caratteristico aspetto (Roberts, 1990).

Scopo della presente ricerca è stato valutare l'efficacia del CASO, su trote di allevamento con lesioni da Saprolegnia, nel corso del trattamento sperimentale in vasca di medicazione.

MATERIALI E METODI

Vasca di medicazione: vasca di medicazione in PVC, di forma rettangolare, delle dimensioni di 2 x 3 x 1,1m e della capacità massima di poco superiore ai 6m³. Il CASO è aggiunto alla concentrazione dell'1,5%, unitamente ad HCl 1N alla dose di 2,5 ml/Litro.

Controlli istologici: Dopo 24 ore e a 7 giorni di permanenza in vasca di medicazione, alcuni soggetti sono stati prelevati e sottoposti a controllo clinico e prelievo di tessuto dal margine e dalla parte centrale delle lesioni cutanee. Il prelievo è stato eseguito mediante bisturi rotondo da dermatologia.

I campioni prelevati, consistenti in frammenti di tessuto di circa un centimetro di diametro, sono stati immersi in un fissativo costituito da paraformaldeide al 10% in tampone fosfato 0.1M pH 7.3. Successivamente sono stati sottoposti a lavaggi nel suddetto tampone e, dopo la disidratazione, inclusi in una resina JB4 specifica per la microscopia ottica. Le sezioni di 5µm, effettuate con ultramicrotomo Reichert-Jung, sono state montate su vetrini elettrostatati (Superfrost, Bioptica, Milano) su cui sono state effettuate le colorazioni con blu di metilene /blue di toluidina e la reazione all'acido periodico di Schiff (PAS) per la valutazione istochimica dei mucopolisaccaridi prodotti dalle "globet cells" e del muco ricoprente la cute dei pesci.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'esame istologico delle biopsie prelevate dalle trote sottoposte al bagno terapeutico con CASO si è osservata la totale perdita del tegumento con "esposizione" più o meno estesa del derma nelle aree centrali delle lesioni e, in alcuni casi, messa a nudo del tessuto muscolare sottostante, in quei pesci che risultavano affetti da ulcerazioni cutanee. A livello periferico delle aree ulcerate era invece osservabile il passaggio graduale da aree in cui l'epidermide appariva molto assottigliata ed in cui erano praticamente assenti le "globet cells", ad aree in cui lo strato epidermico andava normalizzandosi, raggiungendo lo spessore fisiologico. Mentre nei soggetti mantenuti come controllo non venivano osservate sostanziali variazioni di spessore e morfologia dello strato epidermico delle aree lese ai differenti campionamenti, i soggetti trattati evidenziavano una pressoché totale "restitutio ad integrum" della lesione ulcerosa, nei prelievi effettuati in settima giornata. In alcune trote con lesioni poco estese, è stato possibile osservare come il trattamento non solo abbia totalmente eliminato l'infezione da *Saprolegnia spp.* (tampone negativo alla semina su terreni selettivi e assenza di ife al controllo istologico), ma abbia indotto una iperplasia dello strato basale dell'epidermide che ha permesso una totale riepitelizzazione del cratere ulceroso, nonché (come evidenziato tramite colorazione con metodo PAS, specifico per l'evidenziazione dei mucopolisaccaridi acidi, nonché con metodo al "nuovo blu di metilene", evidenziante la metacromasia degli stessi) si sia perfettamente ripristinato nel numero e nella morfologia lo strato delle globet cells, con secondaria ricomparsa del "film" mucoso di rivestimento epidermico (Fig. 1 e 2).

L'esame istologico di branchie (Fig. 3 e 4), rene (Fig. 5 e 6) e milza (Fig. 7 e 8), di trote sacrificate dopo permanenza di 7 giorni in V.M., ha evidenziato aspetto fisiologico di tali organi. Di particolare rilievo l'assenza di lesioni da *Saprolegnia* a livello branchiale e di quadri patologici riferibili a iperplasia/metaplasia squamosa reattive, di norma presenti e secondarie a contatto con sostanze irritanti o tossiche (che alterano il pH dell'acqua). Similmente anche a livello splenico e renale non sono stati osservati quadri riferibili ad alterazioni indotte da metaboliti di sostanze nocive o tossiche.

Dalle nostre ricerche risulta che il CASO, una volta disciolto com-

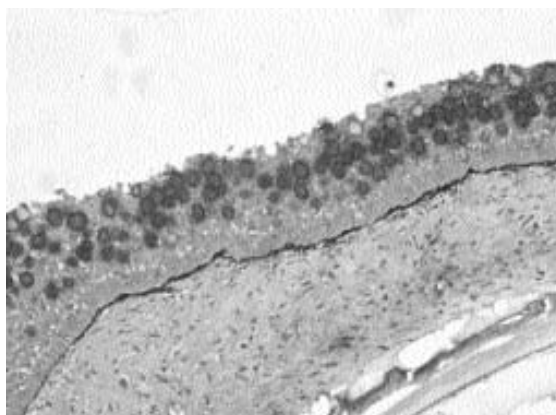


Fig. 1. Cute di trota controllo; si osservi la normale morfologia dell'epidermide (il cui spessore è in rapporto quasi costante di 1:1 con il derma sottostante) e la notevole concentrazione di "globet cells" a vario stato maturativo. Colorazione blu di metilene/blue di toluidina; 10X. *Skin control: normal structure of epidermis (constant ratio 1:1 with below derma) and several concentration of "globet cells" at various development stage. Staining blue Methilene/blue Toluidine 10x.*

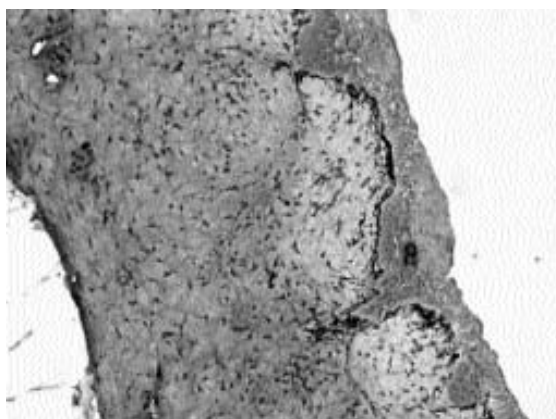


Fig. 2. Cute di trota dopo 7 giorni di trattamento. Si nota un notevole ispessimento reattivo del derma, ampiamente infiltrato di elementi melanomacrofagici, unitamente ad una riepitelizzazione totale di un cratere ulceroso, in assenza di miceti. È inoltre osservabile un iniziale accenno di ricomparsa delle "globet cells" per il ripristino del muco di rivestimento superficiale. Colorazione blu di metilene/blue di toluidina; 10X. *Skin after 7 days of treatment. Several reactive derma thickening, with marked melanomacrophagic infiltrate and total ulcer's reepithelization, without fungus. Furthermore, we can see the first reappearance of the "globet cells" for the presence of new superficial mucous coating. Staining blue Methilene/blue Toluidine 10x.*

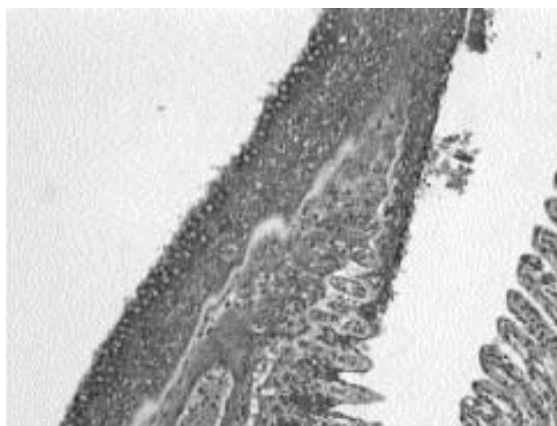


Fig. 3. Branchie: trota controllo. È osservabile la caratteristica struttura branchiale caratterizzata dalla presenza di una moderata metaplasia squamosa apicale para fisiologica a livello di una lamella primaria, da cui si dipartono le lamelle secondarie rivestite da epitelio normostrutturato. Colorazione blu di metilene/blue di toluidina; 10X. *Gill, control. branchial structure characterized by the presence of a moderate paraphysiological apical squamous metaplasia at level of a primary lamella, where the secondary lamellas with a coating of normal structured epithelium depart. Staining blue Methylene/blue Toluidine 10x.*

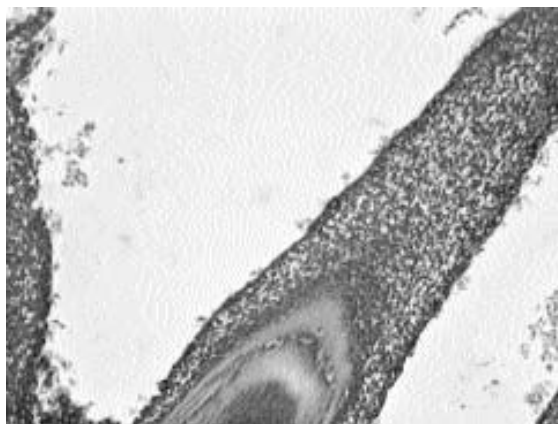


Fig. 4. Branchie di trota dopo 7 giorni di trattamento. A livello di una lamella primaria si osserva un modico aumento dell'area di metaplasia squamosa apicale, pur in assenza di lesioni da Saprolegnia. Colorazione blu di metilene/blue di toluidina; 10X. *Gill after 7 days of treatment. A primary lamella shows a modest rise of the apical squamous metaplasia area, without saprolegnia lesions. Staining blue Methylene/blue Toluidine 10x.*

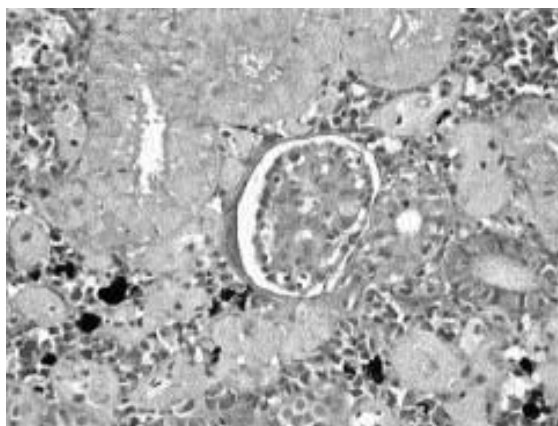


Fig. 5. Rene, trota controllo. Normale morfologia di un nefrone caratterizzato da glomerulo e strutture tubulari annesse. Sono visibili alcuni melanomacrofagi in sede interstiziale. Colorazione blu di metilene/blue di toluidina; 40X. *Kidney, control. Normal morphology of a nephron showing glomerulus and tubular structure. Some melanomacrophages are present into the interstitial space. Staining blue Methylene/blue Toluidine 40x.*

pletamente nell'acqua in presenza di Acido Cloridrico, si è dimostrato efficace nel contenere la saprolegniosi nei soggetti con lesioni molto estese e nel guarirla in quelli colpiti in forma più modesta. La

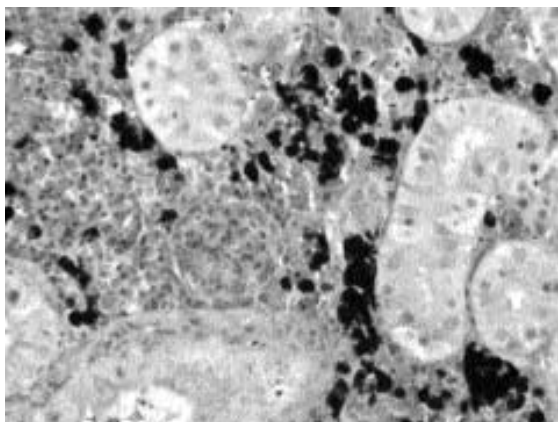


Fig. 6. Rene, trota a 7 giorni di trattamento. La morfologia dell'organo appare conservata, pur in presenza di un aumento della popolazione melanomacrafigica infiltrante l'interstizio. Colorazione blu di metilene/blue di toluidina; 40X. *Kidney, after 7 days of treatment. The morphology of the tissue is preserved, but there is an increase of interstitial melanomacrophagic infiltration. Staining blue Methylene/blue Toluidine 40x.*

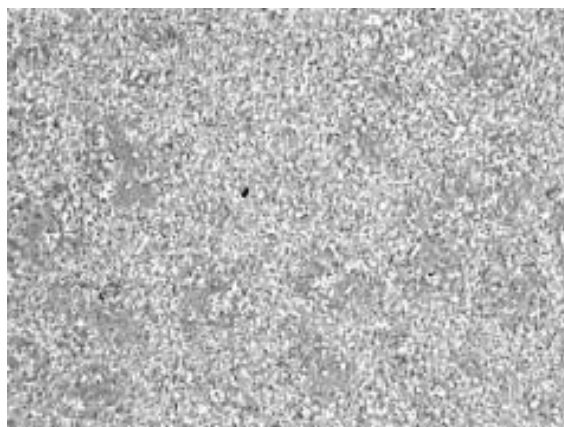


Fig. 7. Milza di trota controllo. Parenchima splenico in stato di non attivazione (assenza di melanomacrofagi) e con follicoli di tessuto linfoide non espansi. Colorazione blu di metilene/blue di toluidina; 10X. *Spleen, control. Inactive Spleenic tissue without melanomacrophages and unexpanded lymphoid follicles. Staining blue Methylene/blue Toluidine 10x.*

notevole efficacia del trattamento appare mediata anche dalla capacità dello stesso di contenere la carica microbica cutanea e delle acque che, secondariamente, aggrava le lesioni ulcerose cutanee. L'effetto

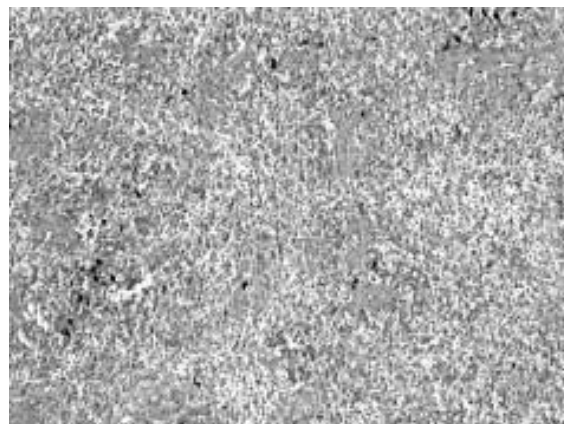


Fig. 8. Milza di trota a 7 giorni di trattamento. Aspetto sostanzialmente identico al tessuto splenico del controllo, ma con lieve aumento della componente melanomacrogica. Colorazione blu di metilene/blue di toluidina; 10X. *Spleen, after 7 days of treatment. Normal architecture of the splenic tissue, with a small rise of melanomacrophages. Staining blue Methylene/ blue Toluidine 10x.*

antifungino e batteriostatico del trattamento appare correlato al fatto che solo pochi microrganismi “alofili” sono in grado di sopportare variazioni di salinità così spinte come quelle indotte dal trattamento con CASO; la trota al contrario riesce a sopportare abbastanza bene anche brusche variazioni di salinità poiché, come tutti i salmonidi, presenta meccanismi di regolazione dell’osmosi tessutale che ne permettono la sopravvivenza sia in acqua dolce, che in acque salmastre.

I quadri istologici hanno confermato quanto osservato ai controlli clinici evidenziando processi riparativi tissutali secondari al trattamento, in assenza di patina micotica e batterica.

I risultati ottenuti, appaiono indicativi dell’efficacia del trattamento con CASO in corso di Saprolegniosi. Il trattamento unisce all’efficacia, un basso impatto ambientale e appare conforme alle strategie sanitarie che tendono a limitare sempre più l’uso dei farmaci nelle produzioni zootecniche. I risultati ottenuti suggeriscono infine un nuovo approccio nei confronti di questa malattia che può essere definita a tutti gli effetti come “condizionata” o “tecnopatìa” tramite un piano di prevenzione che preveda l’uso del CASO o di altri prodotti a base di NaCl nelle vasche dei riproduttori prima della spremitura allo scopo di contenere il rischio di contaminazione micotica delle uova e dello sperma.

BIBLIOGRAFIA

- ALBORALI L., CARBONI A. (1997). Guida pratica di Acquacoltura e Ittiopatologia. La Selezione Veterinaria, 12, CAP 5.3.1.
- CATAUDELLA S., BRONZI P. (2000). Acquacoltura responsabile, verso le produzioni del terzo millennio. Ed. UNIMAR-UNIPROM. Roma, 499-507.
- GHITTINO P. (1983). Tecnologia e Patologia in Acquacoltura. 2: 151-155.
- ROBERTS R.J. (1990). Patologia dei pesci. Ed. Edagricole. Bologna, 178-182.
- SCHIAVO A. (1994). Igiene e sanità in Acquacoltura. Giuseppe Laterza Editore. Bari, 97-99.
- SCHIAVO A. (1997). Malattie e prevenzione nell’Acquacoltura Comunitaria. Giuseppe Laterza Editore. Bari, 255-257.